

MANUAL DE HEMATOLOGIA

INDICE

Objetivo.....	3
Biometría hemática.....	4
Punción capilar.....	5
Punción venosa.....	6
Anticoagulantes.....	8
–Tabla.....	9
Determinación de hemoglobina (Hb).....	10
Determinación de hematocrito.....	12
Cuenta eritrocitaria.....	13
Índices eritrocitarios.....	16
Cuenta leucocitaria.....	17
Cuenta diferencial leucocitaria.....	19
Tinción de Wright.....	21
Cuenta plaquetaria.....	23
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

MANUAL DE HEMATOLOGÍA

Objetivo: Repasar y conocer mejor las técnicas más importantes del laboratorio de hematología, así como sus beneficios y la importancia de éstas a la hora de detectar enfermedades

* BIOMETRÍA HEMATICA

Incluye:

Hemograma

– cuenta plaquetaria

- cuenta leucocitaria

- cuenta eritrocitaria
- hematocrito (HT)
- índices eritrocitarios
- cuenta diferencial leucocitaria

Fundamentación Teórica:

Es una prueba de detección básica y constituye la técnica de laboratorio que se pide con más frecuencia.

Los datos que proporciona constituyen información diagnóstica muy valiosa sobre el sistema hematológico y otros aparatos del cuerpo, pronóstico, respuesta al tratamiento y recuperación.

Consta de una serie de pruebas que determinan el número, variedad, porcentaje, concentración y calidad de las células sanguíneas.

Preparación del paciente:

- 1.– Evitar la tensión todo lo posible debido a que las alteraciones fisiológicas cambian los valores.
- 2.– Tanto la deshidratación como la sobre hidratación alteran en forma considerable los valores.
- 3.– No es necesario el ayuno, sin embargo los alimentos con un alto contenido en grasas alteran los resultados.

*PUNCIÓN CAPILAR

Fundamento teórico:

Para tomar una muestra en forma adecuada se necesita la técnica correcta y el momento preciso en caso necesario.

Cuando se necesita un frotis de sangre periférica, se prefiere la sangre capilar.

Metodología:

- 1.– Tome la muestra de las yemas de los dedos o lóbulo de la oreja (adultos); del dedo pulgar del pie o del tobillo (en lactantes).
- 2.– Desinfecte el sitio de la punción, séquelo y puncione la piel con una lanceta estéril que no debe penetrar más de 2 mm; si se utiliza isodine, permita que se seque completamente.
- 3.– Deseche la primera gota de sangre. Tome las gotas subsecuentes en un microtubo y prepare las laminillas con esa muestra.

Recomendaciones:

No oprima el sitio de la punción para obtener sangre porque se altera la composición hemática o invalida los resultados.

Muchas veces se facilita la toma e muestra si se calienta la extremidad o se coloca en postura colgante.

Preparación del cliente:

Instruya al paciente sobre el propósito y la técnica de su prueba.

Cuidado del paciente después de la prueba:

Aplique una pequeña curación o cinta adhesiva sobre el sitio de la punción, si bien hay que verificar presencia de hemorragia. De haberla, presione; en caso de que persista el sangrado, busque en los antecedentes del paciente si ha sido sometido a un tratamiento con anticoagulantes (aspirina).

*PUNCION VENOSA

Fundamento teórico:

La punción venosa permite extraer una mayor cantidad de sangre para las pruebas necesarias. Las venas de elección suelen ser las de la cara anterior del antebrazo porque resulta fácil acceder a ellas. Las cifras hemáticas permanecen constantes no obstante el sitio seleccionado para obtener la punción venosa.

Metodología:

- 1.- Coloque un torniquete en la parte superior del brazo para producir congestión venosa.
- 2.- Pida al paciente que abra y cierre el brazo y cierre el puño varias veces. Escoja una vena accesible.
- 3.- Limpie el sitio de punción y séquelo con una gasa estéril. El isodine debe secarse.
- 4.- Puncione la vena según la técnica explicada por la maestra. En el adulto, las agujas de calibre 21 mas o menos dificultan la extracción de sangre.
- 5.- Una vez que penetra en la vena, la sangre llena los tubos aspiradores automáticamente por la presión negativa dentro del tubo.
- 6.- Retire el torniquete antes de extraer la aguja o se producirá una hemorragia.
- 7.- Extraiga la aguja y aplique presión y una cinta adhesiva estéril en el sitio de la punción.
- 8.- El conservador o anticoagulante que se añade al tubo depende de la prueba.

Importante:

Para la mayoría de las pruebas hematológicas se utiliza como anticoagulante el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o edético. Es necesario colocar la cantidad adecuada del anticoagulante, ya que la mayoría de las pruebas se invalidan con sangre muy poco coagulada.

Preparación del paciente:

- 1.- Instruya al paciente sobre la técnica para tomar la muestra. Valore la existencia de problemas hemorrágicos o de circulación o alergias en látex.
- 2.- Avisar al paciente que al introducir la aguja sentirá dolor.
- 3.- Extienda completamente el brazo con la superficie palmar hacia arriba.

4.- Si existen dificultades para extraer la muestra, se entibia la extremidad con toallas húmedas y calientes o con cobijas, además se debe permitir que la extremidad permanezca inclinada durante varios minutos antes de realizar la punción.

Cuidados después de la prueba:

No extraiga sangre de la misma extremidad utilizada para la administración intravenosa de medicamentos, líquidos o transfusiones.

La punción venosa causa infección, alteraciones, o retraso en la cicatrización.

El torniquete prolongado provoca éxtasis y hemoconcentración.

*Anticoagulantes

Fundamento teórico:

Los anticoagulantes son medios que actúan como bloqueantes de la coagulación o bien de la agregación de plaquetas.

Se utilizan para romper el trombo o bien para prevenir que los trombos se repitan. La heparina alarga el tiempo de coagulación. Se administra mediante inyección subcutánea, pero también hay otros grupos que se toman por vía oral.

En éstos grupos de medicamentos debe hacerse un control de tiempo de coagulación para evitar un exceso de actividad y como consecuencia la aparición de hemorragias.

Hay dos sales: cálcica y sódica. La cálcica se usan vía subcutánea, pero los dos se pueden usar endovenosas. La heparina se utiliza cuando es preciso. La acción de anticoagulantes es rápida y de poco tiempo. En el manejo de la acción anticoagulante prolongada se utiliza acecumorol.

Se han utilizado diversas medicaciones como anticoagulantes plaquetarias, la aspirina y medicamentos vasodilatadores, como el dipridamol, ambos tienen un mecanismo diferente de acción y pueden asociarse para obtener una sinergia de acción.

Tabla de anticoagulantes:

TIPOS	Forma de usarse	Ventajas	Desventajas
Precipitantes: Oxalatos de amonio y potasio.	3 partes de amonio y 2 partes de potasio. Usar 2 mg/ml de sangre.	Barato, fácil de preparar. No afecta el volumen regular medio.	Degeneración de los granulocitos. Utilidad limitada a los primeros minutos en extensiones.
Ionizantes: • Secuestro EDTA al 10 % • Citrato de sodio al 3.8%	1-2 mg/ml de sangre. 9 partes de sangre por 1 de anticoagulante	No altera la morfología aún después de 3 hrs. Evita aglutinaciones de plaquetas, preserva más tiempo la sangre.	
Antitrombóticos:	0.1 -0.2 % mg/ml de sangre	Seco evita las la hemólisis. Útil para	Caro. Frotis teñidos con Wright toman coloración azul difusa.

Heparina		estudios de anemias hemolíticas.	
Carbohidrato ácido			
Mecánico: desfibrinización	Con perlas de vidrio y agitación mecánica.	Útil para células L.E.	-----

*Determinación de hemoglobina (Hb)

Fundamento:

Es una proteína conjugada de color rojo integrantes de los eritrocitos entre un 31–34%.

Existen varios métodos para determinación como hematina ácida, hematina alcalina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y cianometahemoglobina; éste último es el de elección por que es estable en soluciones diluidas, porque existen en el mercado estándares de cianometahemoglobina y porque las lecturas se pueden hacer en espectrofotómetro de uso común y corriente.

La sangre se hemoliza por agregado de un agente densoactivo, con el ferrocianuro de potasio se oxidan el átomo de hierro de ferroso a férrico para producir metahemoglobina. El cianuro de potasio estabiliza la metahemoglobina pasando de cianometahemoglobina. La cloración producida es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina presente.

Material:

- Tubos de ensayo de 13 x 100 ml
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de Salí
- Boquillas
- Gradillas
- Gasa
- Celdas para espectrofotómetro
- Sangre capilar o venosa con anticoagulante.

Reactivos:

- EDTA al 10 % (.07 ml por .5 ml de sangre)
- Reactivo DE Drabkin:

–ferrocianuro de potasio

–cianuro de potasio

–bicarbonato de potasio

- Solución estándar de cianometahemoglobina.
-

Procedimiento:

- 1.– Colocar en un tubo de ensayo 5 ml de reactivo de Drabkin
- 2.– Homogeneizar bien la sangre

- 3.- Llenar en sangre hasta la marca de la pipeta de Sahli
- 4.- Mezclar la sangre con el disolvente
- 5.- Dejar Reposar 10 min. Para la formación de cianometahemoglobina
- 6.- leer a 540 nanómetros en el espectrofotómetro contra un blanco de reactivo.
- 7.- comparar con la curva calibrada de estándares.

Valores de referencia:

Mujeres: 12 –14 gr/dl

Mujeres embarazadas: 11–14 gr/dl

Hombres: 13–19gr/dl

Recién nacidos: 13.19gr/dl

* DETERMINACIÓN del hematocrito

Es sencillo y exacto y es importante para determinar los índices eritrocitarios

Fundamento:

El hematocrito mide el porcentaje del volumen de sangre total pero ocupado solamente por los eritrocitos

Material (macrohematocrito)

- Tubo de Wintrobe que tiene 11.5 cm de largo x 3 mm de luz (hueco). Para el micro se usa el tubo capilar)
- Pipeta Pasteur larga o pipeta para llenado de hematocrito
- Centrífuga
- Sangre capilar (micro) o venosa (macro) con anticoagulante
- Reactivos

Procedimiento:

- 1.- Homogeneizar perfectamente la sangre haciendo girar el tubo
- 2.- Utilizando la pipeta Pasteur se llena de sangre el tubo de Wintrobe exactamente hasta 10, no deben quedar burbujas de aire en el tubo
- 3.-Centrífuga a 3600 rev x min. Durante 30 min.
- 4.- Leer en la línea de separación de la columna de glóbulos rojos sabiendo que cada raya tiene 1%

Valores de referencia:

H= 47 +- 2.5

M= 42+- 2.5

*CUENTA ERITROCITARIA

Introducción:

Cuando la eritropoyésis tiene lugar normalmente, su resultado final es la producción de una célula-eritrocito perfectamente diferenciada y apta para su función principal que es la de transportar oxígeno y CO₂. La falta de núcleo le confiere la virtud de acarrear el oxígeno sin consumir prácticamente nada de él; su forma bicóncava es la que mejor se presta para afrontar la hemólisis; su membrana no admite la salida de hemoglobina.

Fundamento teórico:

Consiste en diluir la sangre con el líquido de Hayem en una proporción exacta y luego examinar al microscopio una pequeña cantidad de la muestra colocada en la cámara de Neubauer, contando el número de elementos que se encuentran en el retículo de la cámara y mediante una operación matemática se obtiene la cifra total.

Material:

- Tubos de ensayo de 13x100mm
- pipetas de Thomas para glóbulos rojos
- cámara de Neubauer
- boquillas
- microscopio
- gasa
- gradilla
- sangre capilar o venosa con anticoagulante

- Cámara de Neubauer

La que más se utiliza es la de Neubauer que presenta un retículo con una superficie total de 9mm² dividida en 9 cuadros de 1mm² los cuatro cuadros grandes de los extremos son los que usualmente se emplean para contar leucocitos. De los 9 cuadros centrales grandes el central es el único dividido en 25 cuadros.

Reactivos:

- EDTA (sal di sódica) al 10%
- Líquido de Hayem:

Cloruro de mercurio 0.5 g

Cloruro de sodio 1.0g

Sulfato de sodio 5.0g

Agua destilada 100ml

Procedimiento:

Las pipetas están constituidas por dos porciones capilares y un bulbo central. El tubo capilar inferior está

dividido en 10 partes iguales con marcos de 0.5 y 1.0.

En el interior del bulbo existe una perla de plástico (roja), para favorecer la mezcla de la sangre con el líquido y en el capilar superior hay una marca 101.

- 1.- llenar con sangre bien mezclada la pipeta de Thoma, hasta la marca 0.5.
- 2.- se limpia cuidadosamente con gasa la parte externa de la pipeta.
- 3.- completar con líquido de Hayem hasta la marca 101.
- 4.- agitar durante 3 minutos para mezclar perfectamente.
- 5.- colocar el cubre hematímetro sobre la cámara.
- 6.- desechar las primeras 4-5 gotas de la pipeta y llenar la cámara por uno de los bordes del cubre hematímetro.
- 7.- se deja que el líquido penetre lentamente entre la cuadrícula y el cubre hematímetro hasta que la plataforma de recuento este completamente cubierto.
- 8.- dejar reposar de 3.5 minutos sobre la platina del microscopio.
- 9.- con objetivo de 40x se encuentran los eritrocitos contenidos en 80 cuadros pequeños; uno central y cuatro de los extremos.

Cálculos:

Si se considera que el retículo central tiene 400 cuadritos se realizará el siguiente cálculo.

$$\underline{N \times 200 \times 10 \times 400} = N \times 10,000$$

80

N= número de eritrocitos contados

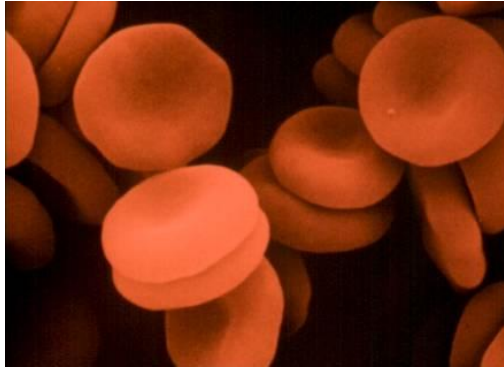
200= factor de dilución

10= corrección x altura de la cámara

Valores de referencia:

Hombres $4.5 \times 10^6 - 5.5 \times 10^6 \text{ mm}^3$

Mujeres $4.3 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6 \text{ mm}^3$



*Índices eritrocitarios

Sirven para clasificar a los eritrocitos de acuerdo a su tamaño y contenido de hemoglobina

Se utiliza el hematocrito y la cuenta de eritrocitos para calcular los índices:

–VCM (Volumen Corpuscular Medio)

–CMHC (Concentración Media de la Hemoglobina Corpuscular)

–HCM (Hemoglobina Corpuscular Media)

Es posible medir de manera directa los índices eritrocitarios en contadores celulares automáticos. Por ejemplo: el coulter; al pasar los eritrocitos a través de un orificio en el cual fluye una corriente eléctrica.

*Cuenta leucocitaria

Introducción:

La leucopoyésis es un proceso que se lleva a cabo con gran actividad, ya que si el número de granulocitos circulantes de ninguna manera es comparable al de los eritrocitos, en cambio se estima que la sobrevivencia de los neutrófilos no excede de 5 días, de las cuales solo pasan 10 hrs. en la sangre circulante.

Fundamento:

La sangre se diluye 1:2 con una solución hipotónica de ácido acético que destruye a los eritrocitos.

El azul de metileno permite reconocer fácilmente el líquido y observar mejor los glóbulos blancos, a los que tiñe ligeramente

Los normoblastos no se destruyen, por lo que se deben tomar en cuenta para corregir los resultados

Material:

- Tubos de ensayo de 13 x 100mm
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Boquillas
- Gasa
- Sangre capilar o venosa con anticoagulante

Reactivos:

- EDTA (sal disódica) al 10 %
- Líquido de Turk:

Ácido acético glacial 3.0 ml

Agua destilada c.b.p. 100 ml

Adicionar 1 o 2 gotas de azul de metileno

Procedimiento

- 1.- Llenar la pipeta con sangre bien mezclados hasta la marca de .5
- 2.- Limpiar cuidadosamente la pipeta por fuera
- 3.- Aforar con solución de Turk hasta la marca de II
- 4.- Agitar la pipeta durante 3 min.
- 5.- Se desechan las primeras 4 o 5 gotas de la pipeta y se carga la cámara de Neubauer
- 6.-Dejar reposar la cámara durante 3 min.
- 7.- En el microscopio con el objetivo de 10x, se cuentan los leucocitos presentes en los cuatro cuadros grandes de los extremos
- 8.- Multiplicar por 50 el promedio de los leucocitos con la siguiente fórmula

Células contadas x 20 (dilución) x 10 (corrección de altura) /

4 (núm. De cuadro de 1mm contados)

Este factor varía si se cambia la dilución y o el número de cuadros contados

*En caso de existir normoblastos (eritrocitos nucleados) deberá hacer la cuenta diferencial leucocitaria

Valores de referencia:

Leucocitos:

–Adultos: 5000 – 10 000 / mm³

– Recién nacidos: 10 000 – 25 000 / mm³

–Niños: 8000 – 15 000

*Cuenta diferencial leucocitaria

Fundamento:

Se realizará este proceso en caso de existir normoblastos (eritrocitos nucleados) en la cuenta leucocitaria

Por este proceso se podrá decir cuantos normoblastos hay por cada 100 leucocitos. Ejemplo:

Si hay 28 normoblastos por cada 100 leucocitos se aplica la siguiente relación:

$$128 - 100$$

$$12000 --- x$$

$$x = 9375 \text{ leucocitos}$$

La cuenta leucocitaria diferencial es el conteo del número de los distintos tipos de leucocitos. Identifica a los individuos con una mayor susceptibilidad a la infección

Técnica:

La cuenta leucocitaria total circulante se divide en 5 tipos de leucocitos:

–neutrófilos (en banda y segmentados). Su citoplasma es incoloro y tiene múltiples granos color gris; o puede ser multilobulado, que posee cuatro lóbulos nucleares.

–eosinófilos: es redondo u ovalado, el núcleo posee no más de tres lóbulos y en el citoplasma se observa no mas de 20 granos color naranja.

–basófilos: se caracterizan por sus grandes granulaciones azul oscuro. Estos gránulos son hidrosolubles.

–linfocitos: Su citoplasma es azul pálido y la cromatina nuclear color púrpura azulado oscuro; casi no posee citoplasma.

–monocitos: su núcleo suele ser arriñonado. Contiene una red de cromatina. El citoplasma se tiñe de un color azul grisáceo y contiene finas granulaciones color rosa.

Valores de referencia:

Neutrófilos:

–en banda 0–11%

–segmentados 25–62%

Eosinófilos: 0–2%

Basófilos: 0–1%

Linfocitos: 25–40%

Monocitos: 3–12%

*Tinción de Wright

Fundamento:

La tinción de Wright es una tinción de tipo Romanowsky.

Es extremadamente importante en el laboratorio de hematología este tipo de tinción, ya que puede obtenerse una cantidad abundante de información a partir del examen de un frotis de sangre periférica bien teñido

Una tinción de Romanowsky consiste en azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina Y o eosina B

La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky y da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofilicos y de color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el azul B y la eosina Y

Las propiedades de tinción de Romanowsky dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul B y la eosina Y. Los agrupamientos de ácidos nucleicos, las proteínas de los núcleos celulares y el citoplasma inmaduro reactivo, fijan el azul B, colorante básico

La eosina Y, colorante ácido, se fija a los agrupamientos básicos de las moléculas de hemoglobina y a las proteínas básicas.

Material:

- Frotis sanguíneo
- Agua destilada
- Eosina B
- Eosina Y
- Azul de metileno
- Alcohol metílico

Procedimiento:

- 1.- Hacer un frotis sanguíneo, ni demasiado delgado, ni que llegue al extremo del portaobjetos
- 2.- Fijar el frotis con alcohol metílico y dejar secar
- 3.- Sumergir el portaobjetos en el hemoclorante 1, durante 5 o 6 segundos
- 4.- Lavar con Buffer 7.2 y sacudir para eliminar exceso
- 5.- Sumergir por 6-8 segundos en el hemoclorante 2
- 6.- Lavar con buffer 7.2 y dejar secar
- 7.- Observar al microscopio

*Cuenta plaquetaria

Fundamento:

Las plaquetas son fragmentos de una célula llamada megacariocito, se encuentran unas 250 mil x mm³, su vida media es de 9.5 días, sus funciones principales son: coagulación y mantener la integridad de las paredes de los vasos.

Miden de 3–4 micras de diámetro, son redondeadas, se pueden observar con una tinción azul de crisil brillante, no tienen núcleo; el número de plaquetas es el resultado del equilibrio entre el número de plaquetas producidas en la médula ósea y las utilizadas, también de la pérdida o destrucción de la sangre periférica.

Material:

- sangre venosa con EDTA al 10%
- tubo de ensayo de 13 x 100ml
- pipeta de Thoma para glóbulos rojos
- cámara de Neubauer
- caja de petri
- gradilla

Reactivos:

- Colorante de azul de cresil brillante
- EDTA al 10 %

Procedimiento:

1.– Asepsia y obtención de la muestra Adultos o niños:

La sangre se extrae de una vena (punción venosa), usualmente de la parte interior del codo o del dorso de la mano. El sitio de punción se limpia con un antiséptico y luego se coloca un torniquete.

–Bebés o niños pequeños:

En los bebés o niños pequeños, el área se limpia con un antiséptico y se punza con una aguja o lanceta para luego recoger la sangre en una pipeta.

2.–Descargar la pipeta en el líquido diluyente

3.–Enjuagar y llenar hasta la marca 1 y con la , muestra de sangre hasta 1.1

4.–Mezclar de 3–5 minutos

5.–Tirar las primeras 3–5 gotas

6.–cargar la cámara cuenta glóbulos

7.– dejar reposar 5 minutos, en una caja petri con un papel filtro húmedo

8.– Dejar reposar la cámara

9.– observar por le objetivo 10x

10.– las plaquetas aparecen como cuerpos coloreados en todo el cuadro central.

Cálculo:

Numero de plaquetas contadas x 1000

Valores de referencia:

150 mil– 450 mil /mm³

Cuidados durante el examen:

Cuando se inserta la aguja para extraer la sangre, algunas personas sienten un dolor moderado, mientras que otras sólo sienten un pinchazo o sensación de picadura. Después, puede haber una sensación pulsátil.

El conteo plaquetario se puede ver afectado por muchos estados patológicos. Igualmente, se puede medir para evaluar la causa de un sangrado excesivo.

Entre los medicamentos que pueden disminuir el conteo de plaquetas están: agentes quimioterapéuticos, cloranfenicol, colchicina, agentes bloqueadores H₂, heparina, hidralacina, indometacina, isoniacida, quinidina, estreptomina, sulfonamida, diuréticos tiazídicos y tolbutamina.

*CONCLUSIONES:

Pudimos repasar y conocer mejor estas técnicas y sobre todo la importancia de conocer bien los procedimientos y de estudiarlos y comprenderlos correctamente, no solo a la hora de calificar la materia, sino para poder ponerlos en práctica y tener un conocimiento general acerca de la sangre, lo cual es la finalidad de la capacitación de laboratorista clínico–hematología, formar íntegramente alumnos capaces de realizar este tipo de análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- Hematología, Salvat, Williams–Heuter–Erstev–Hundles, Tomo I y II
- http://www.umm.edu/esp_ency/article/003647.htm
- Cellules du sang normal et pathologiques, M. Bessis.